

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

* Siehe Rückseite

BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

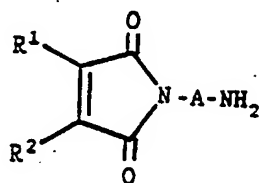
LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IT	Italien	SD	Sudan
CA	Kanada	JP	Japan	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MC	Monaco		

Aminoalkylmaleimide und davon abgeleitete Hapten- und Antigenderivate sowie Konjugate mit Peptiden oder Proteinen

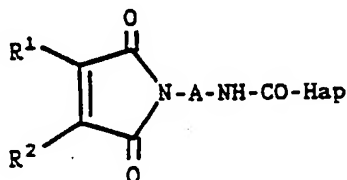
Die Erfindung betrifft neue Aminoalkylmaleimide der allgemeinen Formel I



(I),

in der R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe darstellen, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder eine Carbonylgruppe unterbrochene Alkylenkette mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellt, sowie deren entsprechenden Säureadditionssalze, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminohexylmaleimid.

Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auf die aus Verbindungen der allgemeinen Formel I und immunologischen Bindungspartner gebildeten Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II



(II),

in der R_1 , R_2 und A die oben angegebenen Bedeutungen haben und Hap, der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen bzw. aktivierte Carboxylgruppen tragenden immunologischen Bindungspartner durch Amidierung gebildete Rest ist. Als immunologische Bindungspartner kommen beispielsweise Haptene oder Antigene in Frage.

Außerdem betrifft die Erfindung immunologische Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden oder Proteinen hergestellt werden können. Diese Konjugate werden im folgenden durch den Begriff Hapten-Peptid- oder Antigen-Peptid-Konjugat umschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formeln I und II sowie der Peptid- und Protein-Konjugate, und die Verwendung dieser Konjugate in diagnostischen Bestimmungsmethoden, insbesondere in Immunoassays.

In vielen biochemischen Techniken ist die Verknüpfung von zwei sich funktional unterscheidenden Komponenten bzw. Verbindungen von grundlegender Bedeutung. So werden beispielsweise auf dem Gebiet der Affinitätschromatographie an eine feste unlösliche Trägermatrix verschiedenartige Liganden gebunden. Diese Liganden sind in der Lage, die in einer Probe enthaltenen und für diesen betreffenden Liganden spezifischen Substanzen zu erkennen und zu binden. Dadurch ist eine gezielte Abtrennung der in der Probe enthaltenen Verbindungen möglich. Als Liganden kommen beispielsweise Antikörper oder Enzyme in Frage, die ein Antigen oder ein Substrat spezifisch binden.

Zur Verknüpfung von Komponenten im obigen Sinne werden häufig bifunktionelle Reagenzien, die auch als Linker bezeichnet werden, eingesetzt. Diese enthalten in der Regel zwei chemisch reaktive Gruppen, die mit bestimmten Resten der miteinander zu verknüpfenden Komponenten möglichst spezifisch reagieren. Generell unterscheidet man hierbei zwischen hetero-bifunktionellen Reagenzien einerseits, wie z.B. gamma-Maleimido-buttersäure-N-hydroxy-succinimid oder m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS), und homo-bifunktionellen Reagenzien andererseits, wie z.B. N,N'-Bis-(3-maleimidopropionyl)-2-hydroxy-1,3-propandiamin. Die heterobifunktionellen Reagenzien besitzen zwei chemisch unterschiedliche reaktive Gruppen, wie beispielsweise im obigen Fall die Maleimido- und die N-Hydroxy-succinimido-Gruppe. Während die Maleimidogruppe sehr spezifisch mit sulfhydrylhaltigen Verbindungen reagiert,

eignet sich die Hydroxysuccinimidogruppe bevorzugt zur Reaktion mit Verbindungen, die eine Aminogruppe enthalten. Auf diese Weise lassen sich auf elegante Art und Weise zwei Komponenten bzw. Verbindungen miteinander verknüpfen, wobei die eine beispielsweise eine Sulfhydrylgruppe enthält und die andere eine Aminogruppe. In analoger Weise dienen die homobifunktionellen Reagenzien, die zwei chemisch gleichartige reaktive Gruppen enthalten, zur Verknüpfung von Komponenten mit identischen funktionellen Gruppen, wie beispielsweise im obigen Fall von Sulfhydrylgruppen.

Je nach Eigenschaft der miteinander zu verknüpfenden Komponenten kommen demnach eine Reihe von solchen bifunktionellen Reagenzien zum Einsatz (Kia-ki Han et al., Int. J. Biochem. 16 (2), 129 - 145 (1984) und R.E. Feeney, Int. J. Peptide Protein Res. 29, 1987, 145 - 161). So ist beispielsweise in Arch. Biochem. Biophys. 203, 774 (1980) die Verwendung von N-6-Aminohexylmaleimid zur Herstellung einer modifizierten Agarose-Festphase für die Affinitätschromatographie beschrieben.

Aus dem Stand der Technik, wie z.B. der europäischen Patentanmeldung EP-A-0,142,193, ist ferner die Herstellung von Immunogenen bekannt, wobei geeignete Antigene, wie Polypeptide, Oligosaccharide oder Oligonukleotide, an reaktive Gruppen von hydrophoben Verbindungen, wie z.B. Phospholipide, gebunden werden, die durch mindestens eine Gruppe von Glykosiden, vorzugsweise Saponine, mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil komplexiert werden. Im speziellen ist in Beispiel 4 dieser europäischen Patentanmeldung ein β -Endorphin-Derivat beschrieben, in dem eine Aminosäure dieses Dodecapeptids durch eine Maleimido-butylamin-gruppe modifiziert ist. Die Anmeldung enthält jedoch keinerlei Angaben, wie ein derartiges Derivat hergestellt werden kann.

Ein weiteres Anwendungsgebiet bifunktionaler Reagenzien ist die Herstellung von Reagenzien für die klinische Diagnostik. Hierbei werden in zunehmendem Maße Bestimmungsverfahren nach dem Prinzip der Immunoassays durchgeführt, die sich durch besonders hohe Empfindlichkeit auszeichnen. Dabei werden oft Konjugate z.B. aus einem Markierungsenzym und einer zu bestimmenden Substanz, dem

sogenannten Analyten, bzw. einer einen Antikörper bindefähigen Substanz, dem sogenannten Antigen, eingesetzt. Diese Konjugate lassen sich vorzugsweise durch den Einsatz von bifunktionellen Reagenzien herstellen.

Ein weiteres Beispiel aus jüngster Zeit ist die auf dem Gebiet der homogenen Immunoassays immer mehr an Bedeutung gewinnende sogenannte CEDIA-Technik (Clinical Chemistry 32/9, 1637 - 1641 (1986); US-4,708,929). Bei dieser diagnostischen Bestimmungsmethode wird ebenfalls von dem Prinzip der Verknüpfung von zwei Verbindungen Gebrauch gemacht. Dabei wird ein Analyt, der im allgemeinen ein Hapten oder ein Antigen sein kann, an eine enzymatisch inaktive Vorläuferstufe des Enzyms β -Galactosidase angeknüpft. Diese inaktive Vorläuferstufe ist ein Peptid und wird in der oben zitierten Literatur auch als Enzymdonor bezeichnet. Mittlerweile sind eine Reihe von verschiedenen Peptiden als Enzymdonoren bekannt, wie z.B. ED4.

Die Durchführung dieses Tests beruht auf folgendem Prinzip: Das Enzym β -Galactosidase besteht aus vier Untereinheiten, die wiederum aus einer größeren Polypeptidkette, die auch als Enzymakzeptor EA bezeichnet wird, und einer kleineren Peptidkette, Enzymdonor ED genannt, aufgebaut ist. Enzymakzeptor und Enzymdonor sind beide enzymatisch inaktiv, können sich aber spontan zu einem aktiven Tetramer zusammenlagern. Aufgrund der außerordentlich geringen Dissoziationskonstanten des aus Enzymdonor und Enzymakzeptor gebildeten aktiven Enzyms ist die Menge des gebildeten Enzyms direkt proportional zur Menge des vorhandenen Enzymdonors bzw. -akzeptors. Bei der Durchführung von Immunoassays macht man sich die Eigenschaft nun dadurch zu Nutzen, in dem man anstelle des natürlichen Enzymdonors einen chemisch modifizierten Enzymdonor einsetzt. Dieser zeichnet sich dadurch aus, daß ein Analyt kovalent an funktionelle Gruppen des Enzymdonors geknüpft ist. Als Analyte kommen beispielsweise Haptene oder Antigene in Frage.

Das bei der immunologischen Bestimmungsmethode verwendete Testsystem enthält außerdem einen den jeweiligen Analyten spezifisch Immunogen erkennenden Antikörper. Hierbei differenziert der Antikörper in der Regel nicht zwischen freien und kovalent an den Enzymdonor gebundenen Analyten. Der Antikörper ist in einer Menge vorhanden, die ausreicht, um die im Testsystem vorliegenden mit dem Analyten modifizierten Enzymdonor-Konjugate vollständig zu binden. Dadurch wird die spontane Assoziation des Enzymdonors und des Enzymakzeptors zum aktiven Enzym verhindert.

Die Reaktion zur Bestimmung der Konzentration eines Analyten wird nun derart durchgeführt, daß eine definierte Menge der zu bestimmenden Probe zu dem oben beschriebenen Testsystem zugefügt wird. Da es sich bei diesem Reaktionstyp um einen kompetitiven Test handelt, binden die vorhandenen Antikörper, die gegen den Analyten gerichtet sind, sowohl die aus der Probe kommenden freien Analyten als auch einen Teil der mit dem Analyten markierten Enzymdonoren. Der durch die Verdrängungsreaktion durch den freien Analyten ausgelöste freie Anteil des markierten Enzymdonors assoziiert dann spontan mit dem Enzymakzeptor zum enzymatisch aktiven β -Galaktosidase-Tetramer, dessen Konzentration direkt proportional zu der Konzentration des aus der Probe stammenden Analyten ist. Die Menge bzw. die volumenspezifische Aktivität des durch diese spontane Assoziation gebildeten Enzyms β -Galactosidase wird durch Hydrolyse eines geeigneten Enzymsubstrates, beispielsweise von o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid oder Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid und Freisetzung des entsprechenden Chromophors gemessen.

Bei der oben dargestellten erforderlichen Verknüpfung zwischen Immunogen (Analyt) und Enzymdonor besteht das Problem, daß die Modifizierung des Enzymdonors nur an solchen Stellen im Molekül erfolgen darf, die für die Erkennung zwischen Enzymdonor und Enzymakzeptor nicht von Bedeutung sind. Ansonsten wäre die Assoziation zum enzymatisch aktiven Enzymkomplex gestört und der gemessene Wert für das zu bestimmende Hapten würde ein falsches Ergebnis vortäuschen.

Es ist literaturbekannt, daß als Hapten-Enzymdonor-Konjugatbeispielsweise Maleimidyl-benzcarbamyl-digoxigenin eingesetzt werden kann (Clin.Chem. 32, 1637 (1986)). Die Bindung des Haptens Digoxigenin an den Enzymdonor erfolgt durch Umsetzung mit 3-Maleimido-benzoessäure-isocyanat. Die Verknüpfung seitens des Enzymdonors mit dem oben gebildeten Digoxigenin-Derivat erfolgt durch Reaktion einer Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein am Enzymdonor mit der Maleimidogruppe.

Das in dem oben genannten Fall eingesetzte bifunktionelle Reagens hat jedoch den Nachteil, daß einerseits die vorhandene Urethan-Bindung hydrolyseempfindlich ist und das Reagenz somit nicht hinreichend stabil genug ist, und daß ferner durch den vorhandenen Benzcarbamylrest ein Teil der Bindungsaktivität der Antikörper gegen den Linker selbst, d. h. gegen das Brückenmolekül zwischen Hapten und Enzymdonor im Immunogen gerichtet ist. Dies bedeutet, daß bei der Antigen-Antikörper-Reaktion häufig mit Kreuzreaktivitäten zu rechnen ist, die im immunologischen Test zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung führen.

Außerdem besteht das Problem, daß die verwendeten bifunktionellen Reagenzien möglichst stabil und einfach herstellbar sein sollten. Ferner ist es wünschenswert, daß sie mit Haptenen oder Antigenen unter möglichst milden Bedingungen reagieren, und somit die zur Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern als Immunogene verwendbaren Hapten-Peptid-Derivate auf schonende und einfache Weise hergestellt werden können.

Heterobifunktionelle Reagenzien mit einer Maleimidogruppe haben jedoch häufig den Nachteil, daß sie sehr reaktiv sind und leicht zu Maleinsäure-derivaten hydrolysieren. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind sie oft wenig spezifisch für Sulfhydrylgruppen, insbesondere wenn sie in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden. Diese geringe Spezifität kann zu komplexen Reaktionsmischungen führen, die entstehen, wenn die Maleimidogruppe mit anderen reaktiven Gruppen der zu verknüpfenden Peptide oder Proteine, wie z.B. mit Aminen, reagieren. Derartige Nebenreaktionen

führen zu unerwünschten Reaktionsmischungen, die häufig schwierig zu trennen sind. Höchste Reinheit der hergestellten Konjugate ist jedoch erforderlich, um durch Immunisierung Antikörper mit möglichst hoher Spezifität und geringer Kreuzreaktivität zu erhalten.

Es bestand daher die Aufgabe, neue bifunktionelle Reagenzien zur Verfügung zu stellen, die die oben genannten Nachteile nicht aufweisen.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I als heterobifunktionelle Reagenzien vorteilhaft eingesetzt werden können. Insbesondere hat sich gezeigt, daß die zwischen der Maleimido- und der Aminogruppe befindliche Gruppe A für eine geringe Kreuzreaktivität der mit Hilfe der Hapten-Peptid-Konjugate hergestellten Antikörper verantwortlich ist. Dies trifft insbesondere zu für die kurzkettigen Derivate mit einer Kettenlänge in A von 2-5, insbesondere 2, 3 oder 4 Atomen.

R^1 und R^2 in der Formel I können gleich oder verschieden sein und jeweils ein Wasserstoffatom oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe, wie z.B. die Methyl-, Ethyl- oder Isopropylgruppe bedeuten. Bevorzugt stellen R^1 und R^2 jedoch ein Wasserstoffatom dar.

Die Gruppe A bedeutet eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Alkylengruppe mit 2-6, vorzugsweise 2-4 C-Atomen, die gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder durch eine Carbonylgruppe unterbrochen sein kann. In diesem Sinne kommen beispielsweise die folgenden Bedeutungen in Frage:
 $A = -(CH_2)_n-$; $-(CH_2)_m-CH(CH_3)-(CH_2)_o-$; $-(CH_2)_m-C(CH_3)_2-(CH_2)_o-$; $-(CH_2)_m-X-(CH_2)_o-$ mit $X=O, S, CO$; $-(CH_2)_m-CH=CH-$ mit $n=2-6$ und $m=o=1-4$ und $m+o=2-5$. Bevorzugt bedeutet A die Gruppen $-(CH_2)_n-$ mit $n=2,3,4$ oder 5 und $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-S-CH_2-$, $-CH_2-CO-CH_2-$.

Säureadditionssalze der Amine sind Salze mit organischen oder anorganischen Säuren, wie z.B. Essigsäure oder Salzsäure.

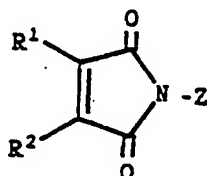
Verbindungen der Formel I können beispielsweise dadurch hergestellt werden, indem man ein Diamin der allgemeinen Formel III



in der A die oben angegebene Bedeutung hat, in eine Verbindung der allgemeinen Formel IV



überführt, wobei Y eine für die Aminogruppe geeignete leicht abspaltbare Schutzgruppe, beispielsweise die tert.-Butyloxycarbonylgruppe darstellt, und anschließend die Verbindung der allgemeinen Formel IV mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V



(V),

in der R_1 und R_2 die oben angegebenen Bedeutungen haben und Z eine reaktive Gruppe bedeutet, nach an sich bekannten Verfahren umgesetzt, und anschließend die Schutzgruppe Y wieder abspaltet.

Die Umsetzung der Diamine der allgemeinen Formel III mit geeigneten Schutzgruppenreagenzien, wie z.B. Di-tert.-butyl-dicarbonat, tert.-Butoxycarbonylchlorid oder N-(tert.-Butoxy-carbonyloxy)phthalimid, erfolgt in Lösungsmittel, wie z. B. Dioxan, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid oder Ethanol bei Temperaturen von - 20 °C bis + 100 °C, vorzugsweise bei 0 °C bis + 25 °C nach an sich bekannten Methoden.

Die Umsetzung der Verbindungen der Formel IV mit Verbindungen der Formel V werden vorzugsweise in basischen Lösungen bei Temperaturen von - 20 °C bis + 80 °C durchgeführt. Als reaktive Gruppe Z kommen solche in Frage, die sich durch Umsetzung mit Aminen leicht abspalten lassen, wie z.B. Alkoxycarbonylgruppen, beispielsweise die Ethoxycarbonylgruppe.

Die neuen Verbindungen der Formel I finden als heterobifunktionelle Reagenzien insbesondere zur Herstellung von Konjugaten Verwendung. Als Konjugate kommen beispielsweise Hapten-Peptid-, Hapten-Protein-, Antigen-Peptid-, Antigen-Protein- oder Antikörper-Effektor-Konjugate in Frage. Im Fall der Antikörper-Effektor-Konjugate wird beispielsweise ein Antikörper kovalent an ein Effektormolekül gebunden, wobei der Effektor ein Analyt, Wirkstoff, Toxin oder auch ein signalproduzierendes Enzym sein kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen der Formel II, in der Hap repräsentativ für einen Bindungspartner steht, der sich als Analyt zum Einsatz bei immunologischen Bestimmungsverfahren eignet. Solche Bindungspartner sind beispielsweise Haptene oder Antigene, die mindestens eine Carboxylgruppe tragen, oder in ein carboxylgruppentragendes Derivat überführt wurden, wie z.B. die Haptene Cortisol, Theophyllin oder Digoxigenin. Antigene können Proteine oder Peptide sein. Es kommen jedoch prinzipiell für die Gruppe Hap alle solche Substanzen in Frage, für die spezifisch gegen sie gerichtete Antikörper gewonnen werden können. Insbesondere geeignet sind solche, die zur Durchführung von Bestimmungsmethoden nach der oben beschriebenen CEDIA-Technik verwendbar sind. Diese Substanzen können insbesondere Analyte sein, d.h. solche Verbindungen, die im Serum von Patienten vorkommen und deren Bestimmung von diagnostischem Interesse ist.

Generell werden unter dem Begriff "Haptene" solche Moleküle verstanden, die für die Bildung von Antikörpern nicht direkt sondern mittelbar über die Bindung an einen geeigneten immunologischen Träger geeignet sind. Beispielsweise seien die folgenden Haptene genannt: Phenobarbital, Diphenylhydantoin, Carbamazepin, Valproinsäure, Thyroxin (T4), Triiodthyronin (T3), Östron, Östradiol, Progesteron, Testosteron, Aldosteron, Folsäure, Methyltetrahydrofolsäure oder Cyancobalamin (Vitamin B12).

Zur Herstellung der Amidoalkylmaleimid-Derivate der allgemeinen Formel II kommen die oben unter Hap definierten Haptene oder Antigene in Frage. Für die Umsetzung der Maleimide der allgemeinen Formel I mit geeigneten Hap-Derivaten ist es zweckmäßig, die in Hap vorhandene Carboxylgruppe zunächst durch Überführung in ein reaktives Derivat zu aktivieren. Dies geschieht beispielsweise durch Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimidester in Gegenwart eines Kondensationsmittels, wie z.B. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid. Der auf diese Weise hergestellte Hap-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester wird dann direkt mit dem Maleimidderivat der allgemeinen Formel I in hoher Ausbeute zu den entsprechenden Maleimid-Hapten-Derivaten der allgemeinen Formel II umgesetzt. Es ist jedoch prinzipiell auch möglich, andere Aktivierungsgruppen der Carboxylgruppe zu verwenden, wie z.B. die Imidazolyl-, Hydroxybenzotriazolyl-, p-Nitrophenyl- oder Isobutoxycarbonylgruppen.

In bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel II ist der immunologische Bindungspartner ein Hapten, wie z. B. ein Steroidhormon oder ein Xanthinderivat, beispielsweise Cortisol, Theophyllin oder Digoxigenin. Prinzipiell können jedoch alle diejenigen Haptene eingesetzt werden, die eine reaktive Carboxylgruppe tragen. Die

Carboxylgruppe kann in freier Form vorliegen oder in Form von aktivierten Derivaten, wie beispielsweise Anhydriden, Estern oder Amiden. Es ist jedoch auch möglich, solche Haptene als Bindungspartner einzusetzen, die ursprünglich keine Carboxylgruppe enthielten, wenn durch chemische Modifizierung die entsprechende Carboxylgruppe nachträglich in das Hapten eingeführt wird. Entsprechende Modifizierungsreaktionen sind aus dem einschlägigen Stand der Technik bekannt.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Verbindungen der allgemeinen Formel II zur Verfügung gestellt, in denen das Hapten ein Steroidhormon ist. Der Nachweis von Steroidhormonen, wie z.B. Östrogen, Testosteron, Cortisonen und Herzglycosiden, denen alle das Steroidgrundgerüst gemeinsam ist, spielt in der Diagnostik eine bedeutende Rolle. Die Zurverfügungstellung von Antikörpern gegen Steroidhormone bzw. gegen die entsprechenden Hapten-Peptid-Konjugate für die Durchführung von Immunoassays ist daher wünschenswert.

Es hat sich erwiesen, daß durch die Derivatisierung der Haptene zu den Verbindungen der allgemeinen Formel II das Epitop des Haptens nicht beeinträchtigt wird, so daß ein gegen das jeweilige in der zu bestimmenden Probe vorhandene freie Hapten gerichteter Antikörper auch das entsprechend modifizierte Hapten-Peptid-Konjugat in gleichem Maße erkennt.

Ebenso hat sich gezeigt, daß die derivatisierten Hapten-Peptid-Konjugate, die durch Umsetzung von Verbindungen der Formel II mit sulfhydrylgruppenhaltigen Peptiden oder Proteinen erhalten werden, ohne weitere Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften mit dem Enzymakzeptor EA zu den Tetramer-Komplexen der β -Galactosidase assoziieren. Diese wiederum zeigen durch die im Prinzip vorhandene Derivatisierung des Enzyms keine nachteilige Beeinflussung der enzymatischen Aktivität, und spalten die in Frage kommenden Substrate in gleicher Weise wie die unmodifizierte β -Galactosidase.

Bei der Verwendung für die Immunisierung werden die Hap-Derivate der allgemeinen Formel II eingesetzt. Das Haptenderivat wird in den zur Antikörperbildung geeigneten Organismus in Abständen mehrmals injiziert. Es kommt dabei zur Bildung von Antikörpern, die in sehr hohem Prozentsatz nun gegen das Hapten gerichtet sind, und keine Kreuzreaktivität mit den Verknüpfungsgruppierungen aufweisen. Die Antikörper werden dann in an sich bekannter Weise aus dem Organismus isoliert und gereinigt. Die erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II eignen sich sowohl zur Immunisierung für die Herstellung polyklonaler Antikörper als auch zur Herstellung monoklonaler Antikörper.

Überraschenderweise gelingt es durch Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II, Antikörper zu erhalten, die sehr wenig Kreuzreaktivität mit der Brückenverbindung aufweisen. Die erhaltenen Antikörper haben eine hohe Affinität zu dem Hapten. Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate zur Immunisierung werden hohe Antikörpertiter erhalten. Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugate besonders gut geeignet zum Einsatz in Immunoassays. Da die Antikörper zu dem Brückenmolekül keine oder eine nur sehr geringe Affinität aufweisen und daher das Hapten sehr spezifisch binden, erhält man mit diesen Konjugaten bei der Verwendung in Immunoassays sehr genaue Ergebnisse.

Die erfindungsgemäßen Haptenderivate der allgemeinen Formel II besitzen den Vorteil, daß sie einerseits die Struktur des freien Haptens weitgehend unverändert beinhalten, andererseits im Vergleich zu Derivaten, die z.B. aus dem Stand der Technik bekannt sind, im Brückenmolekül eine charakteristische Änderung aufweisen. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Haptenderivate ermöglicht deshalb die Durchführung heterologer Linker-Techniken auf einfache und effektive Weise.

- 13 -

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Konjugate, die durch Umsetzung der Verbindungen der allgemeinen Formel II mit Peptiden und Proteinen hergestellt werden können. Als Peptide und Proteine kommen vorzugsweise solche in Frage, die eine Sulfhydrylgruppe bzw. eine Cysteingruppe enthalten, die mit der Maleimidogruppe der Verbindungen der Formel II reagieren. Die Herstellung solcher Derivate erfolgt nach an sich bekannten Methoden der chemischen Modifizierung von Proteinen. Vorzugsweise werden jedoch Peptide, insbesondere die in der oben beschriebenen CEDIA-Technik verwendbaren Enzymdonatoren ED eingesetzt. Die Modifizierung von Peptiden oder Proteinen erfolgt nach an sich bekannten Verfahren in geeigneten Puffern, z.B. Phosphatpuffer, bei Temperaturen zwischen 0°C und 40°C, vorzugsweise bei 15-25°C, durch Inkubation mit Verbindungen der Formel II über einen Zeitraum von 1-24h. Die Herstellung verschiedener ED-Derivate ist aus US 4,708,929 bzw. Clin. Chem. 32 (9), 1986, 1637 - 1641 bekannt, bzw. sind bei Microgenics Corp., Concord, California (USA) erhältlich.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Hapten-Peptid-Konjugates bei der Durchführung von Immunoassays.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung anhand von konkreten Ausführungsbeispielen:

Beispiel 1a) N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-ethan-1,2-diamin

12 g (0.2 mol) Ethylendiamin werden in 200 ml Dioxan/Wasser (50/50 v/v) gelöst. Innerhalb von 1.5 h wird unter Rühren und Kühlung im Eisbad eine Lösung von 21.8 g (0.1 mol) Di-tert.-butyl-dicarbonat in 100 ml Dioxan zugetropft. Man läßt 1 h bei Raumtemperatur weiterrühren, dann wird mit 500 ml Wasser verdünnt und mit 1 l Essigester extrahiert. Die organische Lösung wäscht man dreimal mit je 200 ml Wasser und extrahiert mit zweimal je 300 ml 0.1 n HCl. Die vereinigten HCl-Phasen werden mit 2 n NaOH auf pH 10.0 gestellt und mit 600 ml Essigester extrahiert. Die organische Lösung wird nochmals mit 300 ml Wasser gewaschen, mit 20 g Na₂SO₄ getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingedampft.

Ausbeute: 1.35 g zähes Öl (entspr. 8.4 % d.Th. bez.auf Di-tert.-butyl-dicarbonat).

DC: Kieselgel, Methanol/Essigester (66/33 v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); R_f = 0.14.

b) N-(tert.-Butyloxycarbonyl)pentan-1,5-diamin-Acetat

20.4 g (0.2 mol) Pentan-1,5-diamin werden in 200 ml Dioxan/-Wasser (50/50 v/v) gelöst. Innerhalb von 1.5 h wird unter Rühren und Kühlung im Eisbad eine Lösung von 21.8 g (0.1 mol) Di-tert.-butyl-dicarbonat in 100 ml Dioxan zugetropft. Man läßt 2 h bei 0°C und anschließend 18 h bei 20°C weiterrühren, dann wird mit 500 ml Wasser verdünnt und mit 1 l Essigester extrahiert. Die organische Lösung wäscht man zweimal mit je 200 ml Wasser, trocknet mit 50 g Na₂SO₄ und dampft am Rotationsverdampfer ein. Der halbfeste Rückstand wird mit 200 ml 10%iger Essigsäure digeriert und das ungelöste Bis-BOC-pentan-1,5-diamin abgesaugt. Man dampft das Filtrat ein und trocknet das verbleibende zähflüssige Produkt 4-6 h am Hochvakuum.

Ausbeute: 11.6 g (entspr. 44% d. Th. bez. auf die Di-tert.-butyl-dicarbonat).

DC: Kieselgel, Methanol/Chloroform/Ammniak 45/45/10 (v/v/v)
Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); $R_f=0.65$.

Beispiel 2

a) N-(tert-Butyloxycarbonyl)-2-(N-maleinimido)ethylamin

0.8 g (5 mmol) der nach Beispiel 1a hergestellten Verbindung löst man in 25 ml gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung. Die Lösung wird über ein Falten-filter filtriert und auf 0°C gekühlt. Anschließend gibt man unter Rühren 0.84 g (5 mmol) N-(Ethoxycarbonyl)maleinimid (hergestellt nach der Methode von O. Keller und J. Rudinger, Helv.Chim.Acta 58 (1975), 531-541) zu und läßt 15 min bei Raumtemperatur weiterrühren. Hierbei löst sich das N-(Ethoxycarbonyl)maleinimid nach kurzer Zeit vollständig auf, während die Titelverbindung im Verlauf der Umsetzung ausfällt. Es werden 40 ml THF zugegeben und 45 min bei Raumtemperatur weitergerührt. Danach stellt man mit 1 n HCl auf pH 6.0, extrahiert mit zweimal je 50 ml Essigester und trocknet den Extrakt mit 5 g Na₂SO₄. Nach Eindampfen im Wasserstrahlvakuum wird die Titelverbindung als farbloser, fester Rückstand erhalten.

Ausbeute: 1.1 g (92 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Chloroform/Essigester (66/33 v/v), Besprühen mit 0.1 % KMnO₄-Lsg.; $R_f = 0.50$.

b) N-(tert.-Butyloxycarbonyl)-5-(N-maleinimido)pentylamin

13.1 g (50 mmol) der nach Beispiel 1b hergestellten Verbindung löst man in 250 ml gesättigter Natriumcarbonat-Lösung. Die Lösung wird über ein Faltenfilter filtriert und auf 0°C gekühlt. Nun gibt man unter Rühren 8.4 g (50 mmol) N-(Ethoxycarbonyl)-maleinimid zu und läßt 15 min bei Raumtemperatur weiterrühren, wobei sich das N-(Ethoxycarbonyl)-maleinimid nach kurzer Zeit vollständig auflöst. Anschließend gibt 400 ml Tetrahydrofuran und zusätzlich 250 ml gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zu und läßt 1 h weiterreagieren. Dann wird die Lösung mit 2 x 500 ml Essigester extrahiert, der Extrakt mit 500 ml Wasser gewaschen und mit 50 g Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Eindampfen am Rotationsverdampfer erhält man das Produkt als zähes Öl das am Hochvakuum getrocknet wird.

Ausbeute: 9.6 g (entspr. 68% d. Th.)

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser 40/10/50 (v/v/v),
Besprühen mit 0.1% KMnO₄-Lsg.; R_F=0.85.

Beispiel 3a) 2-(N-Maleinimido)ethylamin-Hydrochlorid

0.96 g (4 mmol) der BOC-Aminoverbindung aus Beispiel 2a werden in 25 ml 2 M HCl in Dioxan gelöst und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Innerhalb 30 - 60 min beginnt das Produkt 4 auszufallen. Man läßt 24 h bei Raumtemperatur stehen, dann saugt man das Kristallisat ab, wäscht mit ca. 10 ml Essigester nach und trocknet im Exsikkator über CaCl₂ und Paraffin.

Ausbeute: 0.58 g farbloses, feinkristallines Pulver (82 % d.Th.).

- 17 -

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 v/v/v), Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt); R_f = 0.22.

$C_6H_9ClN_2O_2$ (176.60); Ber.: C 40.81 H 5.14 N 15.86
Gef.: C 40.60 H 5.29 N 15.46

b) 5-(N-Maleinimido)pentylamin-Hydrochlorid

8.46 g (30 mmol) der nach Beispiel 2b hergestellten BOC-Amino-
verbindung werden in 100 ml 2 m HCL in Dioxan gelöst und bei
Raumtemperatur stehen gelassen. Innerhalb 30-60 min beginnt das
Produkt auszufallen. Man läßt 24 h bei Raumtemperatur stehen,
dann saugt man das Kristallisat ab, wäscht mit ca 50 ml Essi-
gester nach und trocknet im Exsikkator über $CaCl_2$ und Paraf-
fin.

Ausbeute: 4.7 g farbloses, feinkristallines Pulver (entspr. 72%
d.Th.)

DC: Kieselgel, n-Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 (v/v/v),
Besprühen mit Ninhydrin-Spray (Fa. Merck, Darmstadt);
 R_f 0.22

$C_9H_{15}ClN_2O_2$ (218.69); Ber.: C 49.43 H 9.91 N 12.81
Gef.: C 49.19 H 9.99 N 12.59

Beispiel 4 Herstellung von Hapten-Carbonsäure-Derivaten

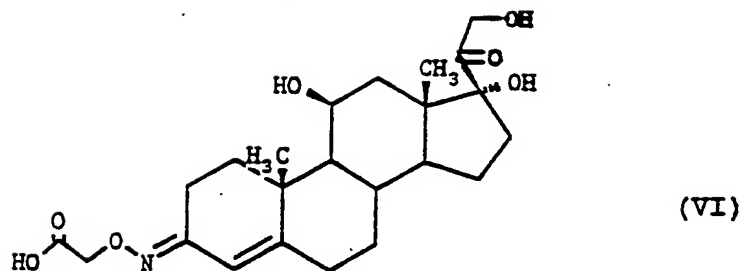
Die folgenden Haptencarbonsäuren wurden nach Literaturvorschriften
hergestellt:

a) Cortisol-3-(O-carboxymethyl)-oxim

aus Cortisol und Carboxymethylhydroxylamin-hemihydrochlorid in
Ethanol

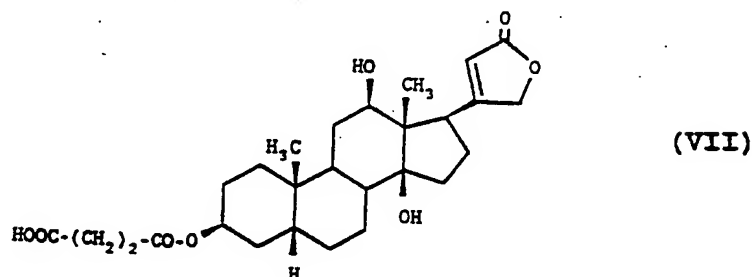
Lit.: A. Tsuji et al., Steroids 24 (1974), 739-51

- 18 -

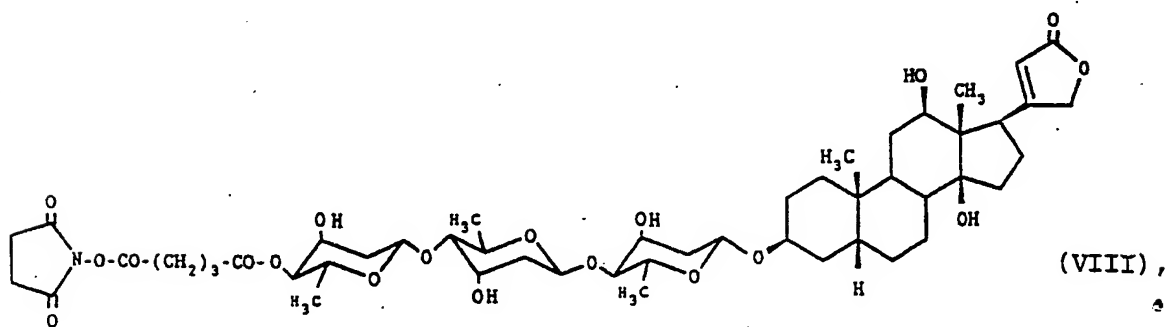
b) 3-O-Succinyl-Digoxigenin

aus Digoxigenin und Bernsteinsäureanhydrid

Lit.: G.C. Oliver et al., J.Clin.Invest. 47 (1968), 1035-1042.

c) Dioxin-4'''-glutaryl-hydroxysuccinimidester

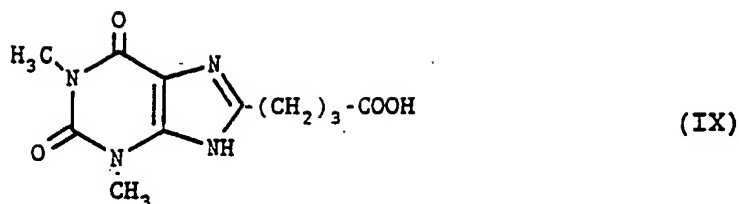
aus Digoxin und Glutaryl-w-orthotrimethylester-w'-hydroxy-succinimidester in THF.

Lit.: H.-G. Batz et al., DE-A-2,537,129 bzw. US-4,133,949,
US- 4-436,828d) 8-(3-Carboxypropyl)-theophyllin

aus 4,5-Diamino-1,3-dimethylpyrimidin-2,6-dion und Glutansäureanhydrid.

C.E. Cook et al., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 13
(1976), 497-505

- 19 -



e) 5-Ethyl-5-phenyl-1-(3-carboxypropyl)barbitursäure

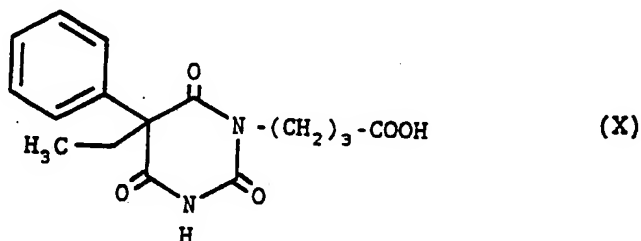
(1-(3-Carboxypropyl)-phenobarbital)

aus Natriumphenobarbital und 4-Brombuttersäure-ethylester

C.E. Cook et al., Quantitative Analogical Studies in Epilepsy

P. Kellaway und Ingemar Petersen (ed.), Raven Press, New York

1976, S.39-58.



Beispiel 5 Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester

Allgemeine Herstellvorschrift

0.5 mmol der nach Beispielen 4 a,b,d,e hergestellten Hapten-Carbonsäuren werden zusammen mit 63 mg (0.55 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 10 ml absolutem DMF gelöst und mit 1.13 mg (0.55 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man läßt 4 h bei Raumtemperatur rühren, filtriert und dampft die Lösung im Vakuum ein. Der Rückstand wird in 20 ml THF aufgenommen und eventuell unlösliche Reste an N,N'-Dicyclohexylharnstoff durch Filtration entfernt. Die Lösungen der Hapten-Carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester werden in dieser Form zur nächsten Stufe eingesetzt.

Beispiel 6Hapten-Carbonsäure-[2-(N-maleinimido)ethylamide]

Allgemeine Vorschrift:

Zur Lösung der aktivierten Haptene aus Beispiel 5 werden 88 mg (0.5 mmol) 2-(N-maleinimido)ethylamin gegeben. Unter Rühren werden 51 mg (0.5 mmol) Triethylamin zugetropft, danach läßt man 6 h bei Raumtemperatur weitererrühren. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft und die Hapten-Maleinimid-Verbindung II A-C durch Säulenchromatographie an einer Kieselgel-Säule (2.5 x 30 cm) mit einem geeigneten Lösungsmittel gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und im Vakuum eingedampft.

Die Lösung der nach Beispiel 5d hergestellten Verbindung wird im Vakuum auf die Hälfte eingeeengt und der Niederschlag abfiltriert. Dann wird das Lösungsmittel im Vakuum vollends entfernt. Der Rückstand wird mit Isopropanol digeriert, das feste Produkt abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

Es werden folgende Produkte erhalten:

a) 2-(N-Maleinimido)ethylamid von Cortisol(3-O-Carboxymethyl)-oxim

Eluent: Essigester/Methanol (90/10 v/v).

Ausbeute: 180 mg (64 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Essigester/Methanol (90/10 v/v); $R_f = 0.60$.

$C_{29}H_{39}N_3O_8$ (557.63); Ber.:	C	62.46	H	7.05	N	7.54
Gef.:	C	62.20	H	7.10	N	7.31

b) 2-(N-Maleinimido)ethylamid von 3-O-Malonyl-Digoxigenin

Eluent: Essigester/Petrolether/Ethanol (40/40/20 v/v/v).

Ausbeute: 145 mg (47 % d.Th.).

- 21 -

DC: Kieselgel, Essigester/Petrolether/Ethanol (40/40/20 v/v/v);
 $R_f = 0.58$.

$C_{33}H_{44}N_2O_9$ (612.71); Ber.: C 64.69 H 7.24 N 4.57
 Gef.: C 64.60 H 7.44 N 4.29

c) 2-(N-Maleinimido)ethylamid von Digoxin-4'''-glutaryl-hydroxy-succinimidester

Eluent: Essigester/Petrolether/Methanol (40/40/20 v/v/v).
 Ausbeute: 220 mg (43 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Essigester/Petrolether/Methanol (40/40/20 v/v/v);
 $R_f = 0.48$.

$C_{52}H_{76}N_2O_{18}$ (1017.15); Ber.: C 61.40 H 7.53 N 2.75
 Gef.: C 61.31 H 7.68 N 2.50

d) 2-(N-Maleinimido)ethylamid von 8-(3-Carboxypropyl)-theophyllin
 Ausbeute: 120 mg (62 % d.Th.).

DC: Kieselgel, Butanol/Eisessig/Wasser (40/10/50 v/v/v);
 $R_f = 0.79$.

$C_{17}H_{20}N_6O_5$ (388.38); Ber.: C 52.57 H 5.19 N 21.64
 C 52.41 H 5.01 N 21.74

e) 2-(N-Maleinimido)ethylamid von 1-(3-Carboxypropyl)-pheno-barbital

Ausbeute: 95 mg (44% d.Th.)

DC: Kieselgel, Essigester/Methanol (90/10 v/v); $R_f=0.83$

$C_{22}H_{24}N_4O_6$ (440.46); Ber.: C 59.99 H 5.49 N 12.72
 59.60 5.79 12.55

Beispiel 7Herstellung von Hapten-Peptid-Konjugaten

200 µg Enzymdonor ED4, beschrieben in US P 4,708,929 (24.11.1987), werden in 150 ml 0.05 m Natriumphosphat-Puffer, pH 6.5, gelöst und mit 20 mg aktiviertem Hapten II A-D in 20 ml Acetonitril versetzt. Man läßt die Lösung 4 h bei Raumtemperatur rühren. Das Konjugat wird durch HPLC an einer C-18 Säule (Dynamax 60A 8, 4.6 x 250 mm; Gradient: 20 - 100 % B, B=Acetonitril/Wasser 65/35 v/v) aufgereinigt. Die Retentionszeit des nichtkonjugierten ED4 liegt hierbei bei 25.35 min. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt und gegen 5 l Wasser dialysiert. Die Lösung des Konjugats kann in dieser Form zu den, in US P 4,708,929 genannten, oder alternativen, immunologischen Testmethoden verwendet werden.

So wurden erhalten:

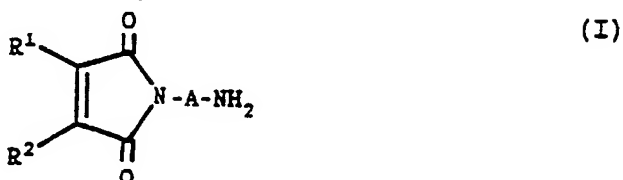
- a) Theophyllin-8-essigsäure-[2-(N-Maleinimido)ethylamid]-ED4-Konjugat
Ausbeute: 12 µg; Retentionszeit (HPLC): 26.91 min.
- b) Phenobarbital-1-buttersäure-[2-(Maleinimido)ethylamid]-ED4-Konjugat
Ausbeute: 155 µg; Retentionszeit (HPLC): 23.78 min.

Beispiel 8Synthese von Cortisol-3-carbonsäure-[2-(N-maleinimido)ethylamid]-
B-Gal-Immunogen

500 mg B-Gal (Boehringer Mannheim Nr. 570 079) werden bei 20°C in 50 ml 0.1 n Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 gelöst und mit 110 mg der nach Beispiel 4a hergestellten Cortisol-Verbindung in 10 ml Dioxan unter kräftigem Rühren tropfenweise versetzt. Nach beendeter Zugabe läßt man ca. 16 h weiterrühren, dann wird die Lösung auf eine AcA 202 Ultrogel-Säule (800 ml Volumen) aufgegeben und mit 0.01 n Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 0.9% NaCl eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen werden gesammelt und die Konzentration durch UV-Absorption bei 280 nm (Proteinkonzentration = $E \times 1.9$ mg/ml) bestimmt. Die Ausbeute an Immunogen liegt typischerweise bei 350 bis 450 mg. Das Proteinkonjugat wird lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt.

Patentansprüche

1. Aminoalkylmaleimide der Formel I

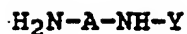


in der R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe bedeuten, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder eine Carbonylgruppe unterbrochene Alkylengruppe mit 2-6 C-Atomen darstellt, sowie deren Säureadditionssalze, mit Ausnahme der Verbindung N-6-Aminoethylmaleimid.

2. Aminoalkylmaleimide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß entweder R_1 oder R_2 Wasserstoff bedeutet.
3. Aminoalkylmaleimide gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß A eine geradkettige Alkylenkette mit 2-5 C-Atomen darstellt.
4. Verfahren zur Herstellung von Aminoalkylmaleimiden nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Diamin der allgemeinen Formel III

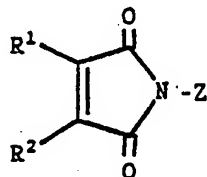


in der A die oben angegebene Bedeutung hat, in eine Verbindung der allgemeinen Formel IV



(IV),

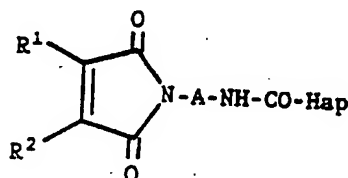
überführt, wobei Y eine leicht abspaltbare Schutzgruppe darstellt, und anschließend die Verbindung der allgemeinen Formel IV mit einer Verbindung der allgemeinen Formel V



(V),

in der R_1 und R_2 die oben angegebenen Bedeutungen haben und Z eine reaktive Gruppe bedeutet, nach an sich bekannten Verfahren umgesetzt, und anschließend die Schutzgruppe Y wieder abspaltet.

5. Amidoalkyl-maleimide der allgemeinen Formel II



(II),

in der Hap der aus einem eine oder mehrere Carboxylgruppen oder Carboxylderivate tragenden Hapten oder Antigen durch Amidierung gebildete Rest ist, R_1 und R_2 gleich oder verschieden sind und eine C_1 - C_4 -Alkylgruppe oder ein Wasserstoffatom bedeuten, und A eine geradkettige oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, gegebenenfalls durch ein Sauerstoff- oder Schwefelatom oder Carbonylgruppe unterbrochene Alkylengruppe mit 2-6 C-Atomen darstellt.

6. Amidoalkyl-maleimide nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Hapten ein Steroid ist.
7. Verfahren zur Herstellung von Amidoalkylmaleimiden der allgemeinen Formel II nach einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß man ein eine oder mehrere Carboxylgruppen oder Carboxylderivate tragendes Hapten oder Antigen mit einer Verbindung der allgemeinen Formel I gemäß den Ansprüchen 1-3 in an sich bekannter Weise umsetzt.
8. Peptid- oder Proteinkonjugate erhältlich durch Umsetzung von Amidoalkylmaleimiden gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 mit einem eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen tragenden Peptid oder Protein.
9. Verfahren zur Herstellung von Konjugaten nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel II gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 mit einem eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen tragenden Peptid oder Protein auf an sich bekannte Weise umsetzt.
10. Verwendung von Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1-3 als heterobifunktionaler Linker.
11. Verwendung von Verbindungen der Formel II gemäß Anspruch 5 oder 6 zur Herstellung von Peptid- oder Proteinkonjugaten.
12. Verwendung von Konjugaten gemäß Anspruch 8 in diagnostischen Bestimmungsverfahren.
13. Diagnostisches Mittel enthaltend Konjugate gemäß Anspruch 8 zur Durchführung von immunologischen Bestimmungen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP90/00957

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl ⁵ : C07D 207/452, G01N 33/535, G01N 33/547		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl ⁵	C07D 207/00, G01N 33/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP, A, 0142193 (AKZO) 22 May 1985 see pages 17,18, example 4 cited in the application	1-17
A	Chemical Abstracts, Volume 93, No. 19, 10 November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol groups via a cleavable connector arm", see page 294, abstract 182140w, & Arch.Biochem. Biophys. 1980, 203(2), 774-9 cited in the application	1
A	EP, A, 0178125 (MALLINCKRODT) 16 April 1986 see the whole document	1-17
A	EP, A, 0158291 (TAKEDA) 16 October 1985 see the whole document ; in particular page 15	1-17
A	DE, A, 2310118 (CASELLA) 12 September 1974 see claims 1-5	1-4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>⁹ Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search 7 September 1990 (07.09.90)		Date of Mailing of this International Search Report 8 October 1990 (08.10.90)
International Searching Authority European Patent Office		Signature of Authorized Officer

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9000957

SA 37530

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 27/09/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0142193	22-05-85	AU-A- 3449784	26-04-85
		AU-A- 3449884	26-04-85
		EP-A- 0142192	22-05-85
		JP-A- 60172932	06-09-85
		JP-A- 60172933	06-09-85
EP-A- 0178125	16-04-86	US-A- 4659839	21-04-87
		AU-B- 598183	21-06-90
		AU-A- 4845185	17-04-86
		CA-A- 1257601	18-07-89
		JP-A- 61093131	12-05-86
EP-A- 0158291	16-10-85	JP-A- 60214259	26-10-85
		JP-A- 60214260	26-10-85
		JP-A- 60214261	26-10-85
		US-A- 4816390	28-03-89
DE-A- 2310118	12-09-74	None	

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 90/00957**

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl.⁵ C 07 D 207/452, G 01 N 33/535, G 01 N 33/547														
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: right; font-size: small;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C 07 D 207/00, G 01 N 33/00</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: x-small;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</div>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int.Cl.⁵	C 07 D 207/00, G 01 N 33/00								
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole													
Int.Cl.⁵	C 07 D 207/00, G 01 N 33/00													
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr.¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0142193 (AKZO) 22. Mai 1985 siehe Seiten 17, 18, Beispiel 4 in der Anmeldung erwähnt --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-17</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Chemical Abstracts, Band 93, Nr. 19, 10. November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol groups via a cleavable connector arm", siehe Seite 294, Zusammenfassung 182140w, & Arch. Biochem. Biophys. 1980, 203(2), 774-9 in der Anmeldung erwähnt --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0178125 (MALLINCKRODT) 16. April 1986 siehe das ganze Dokument -- ./.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-17</td> </tr> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³	X	EP, A, 0142193 (AKZO) 22. Mai 1985 siehe Seiten 17, 18, Beispiel 4 in der Anmeldung erwähnt --	1-17	A	Chemical Abstracts, Band 93, Nr. 19, 10. November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol groups via a cleavable connector arm", siehe Seite 294, Zusammenfassung 182140w, & Arch. Biochem. Biophys. 1980, 203(2), 774-9 in der Anmeldung erwähnt --	1	A	EP, A, 0178125 (MALLINCKRODT) 16. April 1986 siehe das ganze Dokument -- ./.	1-17
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³												
X	EP, A, 0142193 (AKZO) 22. Mai 1985 siehe Seiten 17, 18, Beispiel 4 in der Anmeldung erwähnt --	1-17												
A	Chemical Abstracts, Band 93, Nr. 19, 10. November 1980, (Columbus, Ohio, US), P. Singh et al.: "A solid support for affinity chromatography that covalently binds thiol groups via a cleavable connector arm", siehe Seite 294, Zusammenfassung 182140w, & Arch. Biochem. Biophys. 1980, 203(2), 774-9 in der Anmeldung erwähnt --	1												
A	EP, A, 0178125 (MALLINCKRODT) 16. April 1986 siehe das ganze Dokument -- ./.	1-17												
<div style="font-size: x-small;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div>														
IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. September 1990</td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 08. 10. 90</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt</td> <td style="padding: 5px;">Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten H. Ballesteros</td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. September 1990	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 08. 10. 90	Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten H. Ballesteros								
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. September 1990	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 08. 10. 90													
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten H. Ballesteros													

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP, A, 0158291 (TAKEDA) 16. Oktober 1985 siehe das ganze Dokument; besonders Seite 15	1-17
A	DE, A, 2310118 (CASELLA) 12. September 1974 siehe Ansprüche 1-5 -----	1-4

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9000957
SA 37530

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patendokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 27/09/90
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0142193	22-05-85	AU-A- 3449784	26-04-85
		AU-A- 3449884	26-04-85
		EP-A- 0142192	22-05-85
		JP-A- 60172932	06-09-85
		JP-A- 60172933	06-09-85
EP-A- 0178125	16-04-86	US-A- 4659839	21-04-87
		AU-B- 598183	21-06-90
		AU-A- 4845185	17-04-86
		CA-A- 1257601	18-07-89
		JP-A- 61093131	12-05-86
EP-A- 0158291	16-10-85	JP-A- 60214259	26-10-85
		JP-A- 60214260	26-10-85
		JP-A- 60214261	26-10-85
		US-A- 4816390	28-03-89
DE-A- 2310118	12-09-74	Keine	

EPO FORM P073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82